

УДК 577.37

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ 1,2,3,4 – ТЕТРАГІДРОПІРІМІДО[1,2- $\alpha$ ]БЕНЗІМІДАЗОЛ-2-ОНУ З МОДЕЛЬНИМИ ЛІПІДНИМИ МЕМБРАНАМИ****О.В. Добровольська, Л.В. Січевська, Н.М. Жигалова, О.Д. Рошаль, В.М. Трусова***Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077**e-mail: natalia.n.zhigalova@univer.kharkov.ua*

Надійшла до редакції 11 травня 2009 р.

Прийнята 25 травня 2009 р.

В роботі методами оптичної та флуоресцентної спектроскопії досліджено молекулярні механізми взаємодії препарату для фармакологічної корекції інсулінорезистентності - 1,2,3,4 – тетрагідропірімідобензімідазол-2-ону /ТГПБІ/ з фосфатидилхоліновими /ФХ/ ліпосомами. Коефіцієнт розподілу ТГПБІ в ліпідну фазу  $K_p$  склав  $1810 \pm 300$ , що свідчить про міцне зв'язування препарату з ліпідним бішаром. Визначені за моделлю Ленгмюра параметри зв'язування склали: константа асоціації  $K_a = 0,071 \text{ мкМ}^{-1}$ , число місць зв'язування  $n = 11,2$ , максимальна зміна поглинання ТГПБІ при адсорбції в бішару  $\Delta A_{\text{max}} = 0,29 \pm 0,011$ . Модель розподілу є найбільш прийнятною для аналізу взаємодії ТГПБІ з ліпідним бішаром. ТГПБІ не впливає на трансверсальний розподіл мономерів пірену в мембрані та на полярність гідрофобної області бішару, але знижує щільність пакування ліпідних молекул. Гасіння флуоресценції зондів JC-1 і АНС в присутності ТГПБІ свідчить про збільшення полярності мікрооточення зондів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** 1,2,3,4 - тетрагідропірімідобензімідазол-2-он, фосфатидилхолін, ліпосоми, модель розподілу, параметри зв'язування, абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія, флуоресцентні зонди.

Гетероциклічні сполуки займають важливе місце у фармакології та медицині. Число гетероциклічних речовин, які привертають увагу як потенційні ліки, невпинно зростає. Нещодавно в Інституті проблем ендокринної патології ім. Б.Я. Данилевського АМН України (м. Харків) для фармакологічної корекції інсулінорезистентності було синтезовано новий препарат, що відноситься до ряду спиртів дігідрімідазо[1,2- $\alpha$ ]бензімідазола - 1,2,3,4 – тетрагідропірімідобензімідазол-2-он – ТГПБІ (рис. 1) [1]. За прогнозом авторів ТГПБІ потенційно притаманна антигіпертензивна активність, зокрема вазодилаторні і антиангінальні властивості, можлива також тромболітична дія. Крім цього, автори звертають увагу на прогнозовану відсутність токсичних ефектів [2].

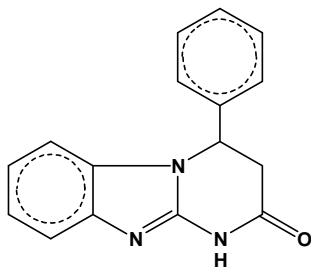


Рис. 1. Структурна формула ТГПБІ

При дослідженні нового класу фармпрепаратів одним з найважливіших питань є вивчення взаємодії досліджуваних ліків з біологічними макромолекулами, зокрема, ліпідним бішаром. Актуальність такого роду досліджень визначається, щонайменше, двома факторами. По-перше, взаємодія ліків з мембраною клітини може бути основою їх фармацевтичної активності. По-друге, встановлення молекулярних механізмів зв'язування фармпрепаратів з ліпідним бішаром є необхідною умовою для створення ліпосомальних форм ліків.

Практичне застосування ліпосом ґрунтується на здатності ліпідного бішару містити в собі й утримувати речовини різної природи. Коло речовин, що включаються в ліпідні везикули, надзвичайно широке - від неорганічних іонів і низькомолекулярних

органічних сполук до молекул білків і нуклеїнових кислот. У той час як водорозчинні речовини включаються у внутрішній водний об'єм ліпосом, ліпофільні молекули локалізуються переважно у гідрофобній області ліпідного бішару. На цей час здатність ліпосом містити в собі самі різні речовини майже необмежена у відношенні хімічної природи, властивостей і розміру молекул. Це дає унікальні можливості для підвищення терапевтичної ефективності фармацевтичних препаратів. З одного боку, препарат, що знаходиться в ліпосомі, захищений її мембраною від дії несприятливих чинників оточення, а з іншого - та ж мембрана не дозволяє токсичному препарату перевищити припустиму концентрацію в біологічних рідинах організму. Ліпосома в даному випадку виконує роль сховища, із якого препарат визволяється поступово, у потрібних дозах і протягом необхідного проміжку часу. З точки зору біологічної сумісності ліпосоми ідеальні як переносники лікарських препаратів, оскільки вони складаються з природних ліпідів, нетоксичні, не викликають небажаних імунних реакцій і повністю біодеградуються в організмі.

Метою даної роботи є дослідження молекулярних механізмів зв'язування ТГПБІ з модельними мембранами, що склалися з цвіттеріонного ліпиду фосфатидилхоліну (ФХ). Для досягнення цієї мети використовували методи спектрофотометрії та спектрофлуориметрії.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В роботі використовували трис-НСІ буфер, пірен, АНС, JC-1 виробництва Sigma Chemical Co, фосфатидилхолін виробництва Біолік (Харків). Ліпосоми готували методом екструзії [3]. Етанольний розчин ФХ випаровували під вакуумним насосом до утворення ліпідної плівки. Після цього плівки гідратували в 5 мМ трис НСІ буферному розчині, рН 7,4 та екструдували крізь полікарбонатний фільтр із діаметром пор 100 нм. Отримані таким чином ліпосоми змішували у необхідному співвідношенні з ТГПБІ та флуоресцентними зондами: піреном, JC-1 та АНС. Суміші зондів з ліпідами інкубували протягом 30 хвилин. Концентрації барвників у пробі складали 5 мкМ, 15 мкМ та 25 мкМ для JC-1, пірену та АНС, відповідно.

Реєстрацію спектрів поглинання та флуоресценції проводили в 1 см кварцових кюветах при 20°C на спектрофотометрі/спектрофлуориметрі Hitachi F-40-10.

### РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

#### Спектрофотометричні дослідження взаємодії ФП із ліпосомами

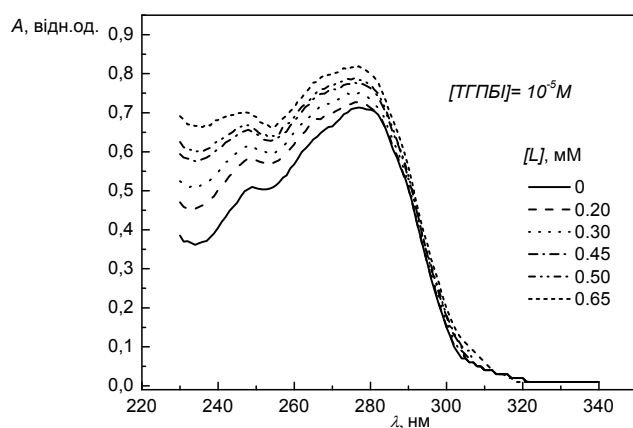


Рис. 2. Спектри поглинання ТГПБІ у присутності ліпосом.

Як проілюстровано на рис. 2, ТГПБІ має широкий спектр поглинання, який характеризується двома піками при 250 та 274 нм, зумовлених поглинанням бензольного кільця та карбоксильної групи, відповідно. Зв'язування фармпрепарату з ліпідними везикулами супроводжується зростанням поглинання ТГПБІ без змін положення максимумів спектру (рис. 2).

Базуючись на вимірюванні поглинання ТГПБІ у ліпосомах, було знайдено коефіцієнт розподілу препарату в ліпідну фазу [4], який визначається наступним співвідношенням:

$$K_p = \frac{Z_l V_w}{Z_f V_l}, \quad (1)$$

де  $Z_f$  і  $Z_l$  - концентрації вільного ТГПБІ та ТГПБІ в ліпосомах,  $V_w$  і  $V_l$  – об'єми водної та ліпідної фази. Об'єм ліпідної фази може бути виражений як:

$$V_l = N_A \cdot C_l \cdot \sum_i v_i \cdot f_i, \quad (2)$$

де  $N_A$  - число Авогадро;  $C_l$  - молярна концентрація ліпіда;  $v_i$  - молекулярний об'єм кожної складової бішару, для ФХ  $v=1.58 \text{ нм}^3$  [5]. За наших експериментальних умов  $V_l$  значно менше загального об'єму ( $V_t=1 \text{ дм}^3$ ), тобто  $V_l \approx V_w$ . Взаємозв'язок між коефіцієнтом розподілу та зростанням поглинання ( $\Delta A$ ) має вигляд:

$$\Delta A = \frac{K_p V_l (A_{max} - A_0)}{1 + K_p V_l}, \quad (3)$$

де  $A_0$  - поглинання ТГПБІ у буфері,  $A_{max}$  – максимальне поглинання ТГПБІ в ліпідному середовищі.

Для кількісної оцінки  $K_p$  експериментальна залежність  $\Delta A(C_l)$ , представлена на рис. 3, була апроксимована рівнянням (3). Одержаний таким чином  $K_p$  склав  $1810 \pm 300$ , що свідчить про міцне зв'язування ТГПБІ з ліпідним бішаром.

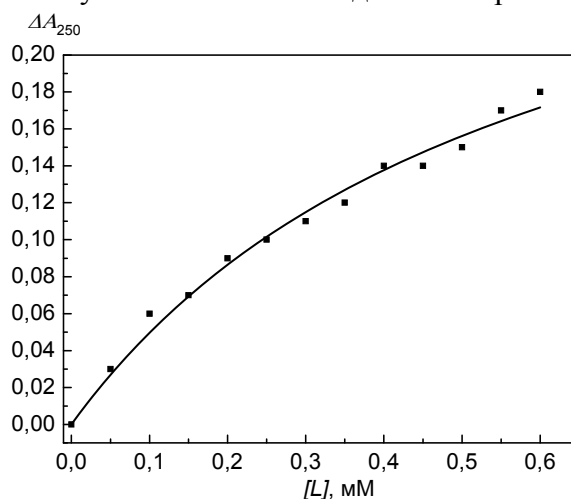


Рис. 3. Залежність зміни поглинання ТГПБІ від концентрації ліпіда

Для отримання більш детальної кількісної характеристики асоціації ТГПБІ з модельними мембранами експериментальні дані були проаналізовані в рамках моделі Ленгмюра, згідно якої  $\Delta A$  може бути виражене як:

$$\Delta A = a_z B_z \quad (4)$$

де  $a_z$  та  $B_z$  – молярна флуоресценція та концентрація ТГПБІ, зв'язаного з везикулами. Якщо на одну молекулу препарату припадає  $n$  молекул ліпиду, то константа асоціації ТГПБІ з ліпосомами ( $K_a$ ) має вигляд:

$$K_a = \frac{B_z}{\left(\frac{C_l}{2n} - B_z\right)(z_0 - B_z)} \quad (5)$$

де  $z_0$  – загальна концентрація ТГПБІ.

Виразивши звідси  $B_z$ , отримаємо:

$$B_z = \frac{(K_a z_0 + \frac{K_a}{2n} + 1) - \sqrt{(K_a z_0 + \frac{K_a}{2n} + 1)^2 - 4K_a^2 z_0 \frac{L_0}{2n}}}{2K_a}, \quad (6)$$

Максимальна зміна поглинання ТГПБІ у випадку його повного зв'язування з ліпосомами

$$\Delta A_{\max} = a_b \cdot z_0.$$

Отже,

$$a_b = \frac{\Delta A_{\max}}{z_0}.$$

Тоді

$$\Delta A_{\text{exper}} = \frac{\Delta A_{\max}}{z_0} \cdot B_z \quad (7)$$

Параметри зв'язування ТГПБІ з ліпосомами, розраховані в рамках моделі Ленгмюра, склали - константа асоціації  $K_a = 0,071 \text{ мкМ}^{-1}$ , число місць зв'язування ТГПБІ  $n = 11,2$ , максимальна зміна поглинання ТГПБІ  $\Delta A_{\max} = 0,29 \pm 0,011$ .

Оскільки для коректного термодинамічного опису процесу комплексоутворення необхідно враховувати ряд стеричних (перекривання місць зв'язування, розмір, форма та самоасоціація ліганда, виключення сусіднього місця зв'язування) та електростатичних ефектів, та найбільш прийнятною для кількісної оцінки зв'язування досліджуваного ліганда з ліпідним бішаром є модель розподілу, яка базується на розгляді нелокалізованої адсорбції.

#### **Аналіз взаємодії ТГПБІ з ліпідними мембранами методом флуоресцентних зондів**

Для аналізу впливу ТГПБІ на структуру ліпідного бішару використовували флуоресцентні зонди – пірен, АНС і JC-1.

Пірен – це неполярний флуоресцентний зонд, який розподіляється, здебільшого, у гідрофобній області ліпідного бішару. При певних концентраціях зонду в мембрані виникають умови, при яких можливо утворення збуджених димерів пірену – ексимерів. Утворення ексимерів є дифузійним процесом і залежить, зокрема, від в'язкості середовища. В'язкість мікрооточення зонду розраховується зі співвідношення інтенсивності флуоресценції мономерів і ексимерів або з концентраційних кривих самогасіння флуоресценції мономерів пірена [6-8]. При кімнатних температурах пірен може утворювати агрегати в ліпідному бішарі. Спектр флуоресценції пірену має вібронну структуру та характеризується п'ятьма піками флуоресценції мономерів зонду

та одним піком емісії ексімерів (Рис. 4). Відносні інтенсивності вібронних смуг відбивають ступінь полярності мікрооточення пірену (так званий «ефект Хама»). Так, наприклад, параметр  $R_{III} = I_I / I_{III}$  (де  $I_I$  – інтенсивність першого піку (369 нм), а  $I_{III}$  – інтенсивність третього піку (380 нм)) дорівнює 1.96 для пірену у воді тоді, як в розчинниках меншої полярності ця величина знижується до значення 0.6 у *n*-гексані.

В наших дослідженнях при додаванні ТГПБІ до суспензії ліпосом відносна інтенсивність третьої вібронної смуги пірену суттєво не змінювалась. Це означає, що ТГПБІ не впливає на трансверсальний розподіл мономерів пірену та на полярність гідрофобної області бішару.

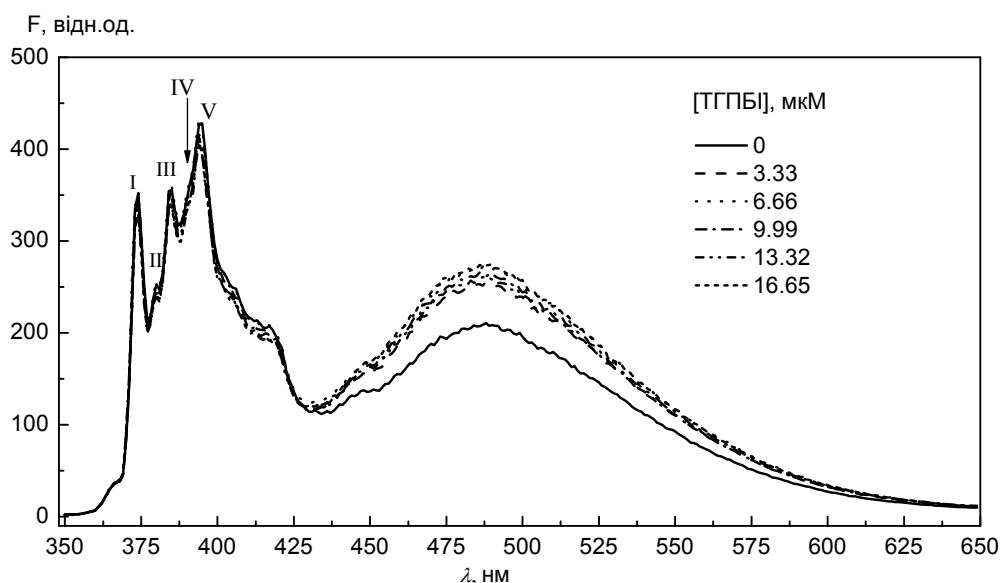


Рис. 4. Спектри флуоресценції пірена в ліпосомах з ТГПБІ. I, II, III, IV, V - вібронні піки пірена.

Наступний параметр, який було використано для характеристики модифікацій структури мембрани, викликаних ТГПБІ, це відношення інтенсивності флуоресценції ексімерів до інтенсивності флуоресценції мономерів (Е/М). Цей параметр характеризує ступінь ексімеризації пірену, який, у свою чергу, залежить від латерального розподілу зонду у площині бішару.

Як показано на рис. 5, ТГПБІ ініціює зростання Е/М, що свідчить про збільшення вільного об'єму мембрани при утворенні комплексів з ліпосомами. Можна припустити, що це є наслідком вбудовування препарату в ліпідний бішар, що призводить до зниження щільності пакування ліпідних молекул.

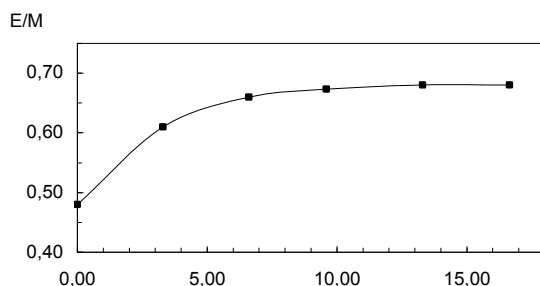


Рис. 5. Зміни ступеня ексімеризації пірена в ліпосомах з ТГПБІ.

Результати, отримані з використанням JC-1 та АНС дещо суперечать висновку стосовно незмінності полярності бішару в присутності ТГПБІ. Так, зв'язування препарату з мембранами призводить до гасіння флуоресценції зондів (рис. 6-8).

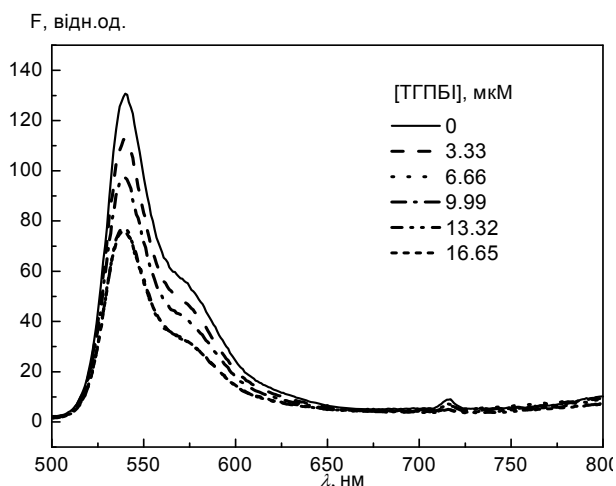


Рис. 6. Спектри флуоресценції JC1 в ліпосомах з ТГПБІ.

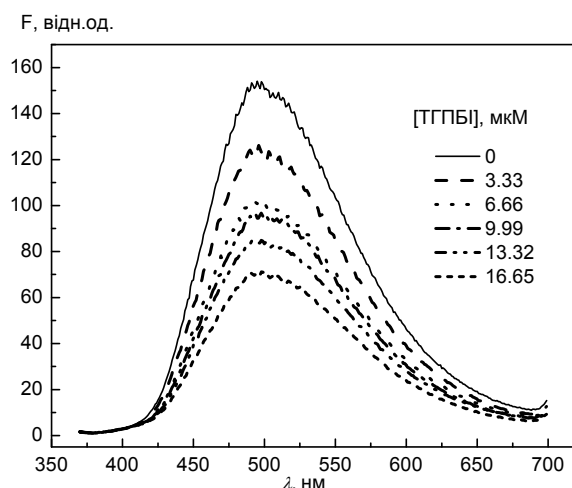


Рис. 7. Спектри флуоресценції АНС в ліпосомах з ТГПБІ.

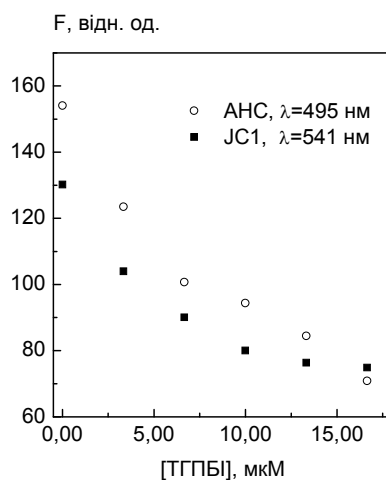


Рис. 8. Гасіння флуоресценції АНС і JC1 в ліпосомах з ТГПБІ.

JC-1 - ліпофільний катіонний барвник, який може існувати в мономерному і агрегованому станах. Для JC-1-мономерів характерна зелена флуоресценція ( $\lambda = 525$  нм), а для JC-1-агрегатів - жовто-червона ( $\lambda = 590$  нм) при  $\lambda_{\text{зб.}} = 475-480$  нм. У свою чергу, АНС – флуорохром з негативним зарядом, який розташовується в найбільш функціонально активному поверхневому шарі, що має відношення до рецепторної активності клітини і формування іонних каналів.

Інтенсивність флуоресценції зондів JC-1 і АНС, вбудованих в мембрану ліпосом, зменшувалася при додаванні ТГПБІ. Цей ефект може свідчити про підвищення ступеня гідратації мембрани, який викликає ТГПБІ, і збільшення полярності мікрооточення зонда. Протиріччя між даними, отриманими з використанням пірену та цих двох барвників, може бути пояснене різною локалізацією зондів у ліпідному бішарі.

## ВИСНОВКИ

У спектрах поглинання ТГПБІ виявилися два максимуми при  $\lambda=250$  нм і  $\lambda=274$  нм, обумовлені поглинанням ароматичного кільця і карбоксильної групи. При додаванні ліпосом спостерігалася збільшення оптичної густини в максимумах спектра. Ці ефекти були кількісно інтерпретовані в рамках моделі розподілу ліганда між двома фазами і моделі адсорбції Ленгмюра.

Коефіцієнт розподілу ТГПБІ між водною і ліпідною фазою склав  $K_p=1810\pm300$ . Параметри зв'язування, розраховані в рамках моделі Ленгмюра, склали - константа асоціації  $K_a=0,071$  мкМ<sup>-1</sup>, число місць зв'язування ТГПБІ  $n=11,2$ . Модель розподілу найбільш прийнятна для аналізу взаємодії ТГПБІ з ліпідним бішаром.

Високі значення коефіцієнта розподілу ТГПБІ у ліпідній фазі дозволяють розглядати ліпідні везикули як ефективні переносники досліджуваного ТГПБІ.

Збільшення ступеня ексімеризації пірена при введенні препарату свідчить про збільшення швидкості латеральної дифузії зонду в ліпідному бішарі, що є наслідком зростання вільного об'єму мембрани. Можна припустити, що препарат вбудовується в ліпідний бішар, знижуючи при цьому щільність пакування ліпідних молекул.

Інтенсивність флуоресценції зондів JC-1 і АНС зменшувалася в присутності ТГПБІ, що свідчить про збільшення полярності мікрооточення зонду і гасіння флуоресценції водою.

Автори висловлюють подяку Липсон В.В. за наданий препарат 1,2,3,4 – тетрагідропіримідо[1,2- $\alpha$ ]бензімідазол-2-она і Горбенко Г.П. за корисне обговорення отриманих результатів.

## Список літератури

1. Липсон В.В., Орлов В.Д., Десенко С.М., Шишкина С.В., Шишкин О.В., Широбокова М.Г. 1,2,3,4-Тетрагідропіримідо[1,2- $\alpha$ ]бензімідазол-2- и 4 -оны // Химия гетероциклических соединений. – 2000. - № 9. – С. 1190-1196.
2. Липсон В.В. Азолоазинові системи з частково гідрогенованим азиновим фрагментом: Автореф. дис. ... докт. хім. наук: 03.00.03 / Харк. нац. ун-т імені В.Н. Каразіна. - Х., 2007. – 33 с.
3. MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.Ph.M., Takeshita K., Subbarao N.K., Hu Lan-rong. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. - V. 1061, Is. 2. – P. 297-303.
4. Santos N.C., Prieto M., Castanho M.A.R.B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: an emphasis on optical spectroscopic methods // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1612. – P. 123-135.
5. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя. – М.: Наука, 1981. – 296 с.
6. Литвинов И.С., Образцов В.В. Изучение вязкости свободных и связанных с белком липидов в мембранах // Биофизика.- 1982.- Т.27, вып.1. – С. 81-85.
7. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
8. Добрецов Г.Е., Спирин М.М., Карманский И.М. Оценка глубины погружения остатков триптофана в липидную фазу сывороточных липопротеидов низкой плотности // Биохимия. – 1980. – Т. 45, №4. – С. 622-628.